

STANOVENÍ KONCENTRACE PROTILÁTEK PROTI NUCL METODOU ELISA

Princip:

Vzorky séra jsou inkubovány v mikrotitračních destičkách v jamkách pokrytých specifickým antigenem. Jsou-li ve vzorku séra pacienta přítomny odpovídající specifické protilátky, naváží se na antigen. Nenavázaná frakce protilátek je odmyta. Poté je přidán konjugát, tj. protilátky proti lidskému imunoglobulinu konjugované s enzymem. Během následné inkubace dojde k navázání konjugátu na komplex antigen-protilátka, vzniklý v předchozím kroku. Nenavázaný konjugát je odmyt. Poté přidavek substrátu vede k enzymatické reakci s navázaným enzymem. Výsledkem je barevná reakce, která se zastaví přidáním kyseliny. Intenzita zbarvení je úměrná koncentraci vyšetřované látky.

Pomůcky a materiál:

Postup:

1. Vytemperujte soupravu Aeskulisa NUCL 30 min. při laboratorní teplotě.
2. Připravte si ředící roztok- 20 ml koncentrovaného ředícího roztoku doplňte destil. vodou na celkový objem 100 ml.
3. Nařed'te příslušná séra pac. 1 : 100 (před ředěním promíchat):
do Eppendorfký napipetujte 500 ul naředěného ředícího roztoku + 5 ul séra.
(kalibrátory a kontroly ze setu jsou již připraveny k použití)
4. Vyndejte stripý s jamkami z obalu a umístěte do prvních pozic nosiče. Připravte si:
1 A : negativní kontrola
1 B: pozitivní kontrola
1 C: kalibrátor cut off
1 D: kalibrátor 10
1 E: kalibrátor 30
na další pozice nařed'. vyš. séra pacientů dle počtu dalších jamek.
5. Aplikujte kontroly, kalibrátory a naředěná vyš. séra pac. do jamek á 100 ul.
Před aplikací promíchat! Desku přikryjte víčkem a inkubujte 30 min. při lab. teplotě.
6. Připravte si promývací roztok: 20 ml koncentrovaného promývacího roztoku doplňte destil. vodou na celkový objem 1000 ml.
7. Desku promyjte 3x
8. Aplikujte 100 ul konjugátu do každé jamky, konjugát v setu je připraven k použití.
Desku přikryjte víčkem a inkubujte 30 min. při lab. teplotě.
9. Opakujte promytí
10. Aplikujte 100 ul substrátového roztoku TMB do každé jamky, roztok v setu je připraven k použití. Desku přikryjte víčkem a inkubujte 30 min. při lab. teplotě VE TMĚ.
11. Aplikujte 100 ul stop činidla do každé jamky, roztok v setu je připraven k použití, nechte 5 min. působit.
12. Na fotometru odečtěte OD v jamkách destičky při 450 nm - program: **450 IP.mth**.
13. Na výsledkovém listu jsou v horní tabulce hodnoty OD, ve spodní přepočítaný index pozitivity = IP (t.j. podíl OD vzorku a OD cut off v jamce C1).
Výsledkový list podepíšte a označte pozice kontrol, kalibrátorů a měřených vzorků.

Hodnocení IP:

IP 0 - 0,800	negativní	-
IP 0,801 - 1,200	limitní = hraniční	L
IP 1,201 - 1,599	slabě pozitivní	±
IP 1,600 - 2,599	pozitivní	+
IP 2,600 a více	silně pozitivní	++

14. Dle hodnocení IP odečtěte míru pozitivity testu pro příslušné pacienty.

Norma pro hladinu protilátek v séru : negativní

Závěr: